

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

マウスを用いたインフルエンザワクチンの新規安全性試験法に関する研究

研究代表者 百瀬暖佳 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究要旨

インフルエンザワクチンには、マウスやモルモットを用いた様々な動物安全性試験が設定されている。一方、現在われわれが取り組んでいる遺伝子発現解析に基づく新規安全性試験法では、ラットを試験動物として用いている。本研究においては、我々が構築してきた遺伝子発現法による安全性試験において、試験動物種をラットからマウスへ変更可能か検討を行った。これまでラットで得られている結果と同様の結果が、現行の試験動物であるマウスでも得られれば、従来法との相関性がより保たれると考えられる。

研究協力者

倉光 球	国立感染症研究所	佐藤 靖	デンカ生研株式会社
滝澤和也	国立感染症研究所	渡辺隆雄	学校法人 北里研究所
益見厚子	国立感染症研究所	福家 功	一般財団法人
荒木久美子	国立感染症研究所		阪大微生物病研究会
古畑啓子	国立感染症研究所	尾堂浩一	一般財団法人
甲斐 光	デンカ生研株式会社		化学及血清療法研究所

A. 研究目的

インフルエンザHA ワクチンの品質管理として、生物学的製剤基準には原液と小分製品に様々な試験が設定されている。動物を用いた安全性試験としては、原液に対する発熱試験、マウス白血球数減少試験と、小分け製品に対する異常毒性否定試験、マウス白血球数減少試験、マウス体重減少試

験が挙げられ、試験動物としてウサギ、モルモット、マウスを用いている。一方、これまでに我々は、新規安全性試験法の開発研究を実施するためにラットを試験動物として設定してきた。我々の構築している試験法はマーカー遺伝子の発現変動を指標としているため、ゲノム解析が進んでいる動物を選択する必要があったからであ

る。現行の検定試験を遺伝子発現に基づく新規試験法で代替することを考えた場合、ラットを用いた試験法でも問題はないと考えられるが、現行の検定試験と同じ動物種を用いることができればより望ましい。本研究では現行の試験動物のうち、ゲノム解析が最も進んでいるマウスへの変更が可能か検討を行った。

B. 研究方法

1) 動物

4週齢の ddY 系統マウス(メス)を SLC より購入し、解析に用いた。

2) ワクチン

本研究課題では、インフルエンザワクチンのマウス白血球数減少試験用の毒性参照品を、全粒子ワクチン相当品として用いた。高濃度 HA 原液は A/Brisbane/ 59/ 2007 (H1N1)株、A/Uruguay/716/2007 (H3N2)株及び B/ Brisbane/ 60/ 2008 株の 3 型が混合されており、国内メーカー 4 社より提供されたものである。毒性参照品、高濃度 HA 原液、およびその段階希釈液を、各 0.5mL マウス腹腔内に接種した。対照には生理食塩水(SA)を用いた。

3) 採材

ワクチン接種後、1日目にマウスより肺を採取した。一群 3 匹とした。

ワクチン接種したマウスから採取した肺は、速やかに液体窒素中で凍結させ、ISOGEN (Nippon Gene) 中で破碎した。

定法に従って total RNA を抽出した。

4) QuantiGene Plex 法

ワクチン接種マウスの肺から精製した total RNA (20 μ l)は、65 $^{\circ}$ C で 10 分間処理した後、QuantiGene Plex Reagent System 2.0 (Panomics) 添付の Lysis mixture 33.3 μ l、Blocking reagent 2 μ l、Capture beads 1 μ l、Probe set 5 μ l を加えた。これを Hybridization plate にて 54 $^{\circ}$ C 18 時間インキュベートした後、96-well plate に移し 100 μ l の Wash buffer で 3 回洗浄した。次に Pre-Amplifier を加えて 50 $^{\circ}$ C で 1 時間、Amplifier を加えて 50 $^{\circ}$ C で 1 時間、Label probe を加えて 50 $^{\circ}$ C で 1 時間、SAPE を加えて室温で 30 分間処理した。最後に 130 μ l の SAPE wash buffer を加え、Luminex 100 マイクロプレートルミノメーターにより蛍光強度を測定した。発現解析は β -actin に対する相対定量を行った。

(倫理面への配慮)

本研究課題の動物実験計画にあたっては、使用動物数を必要最少数とし、実験中の生理的および心理的苦痛を軽減するための最大限の努力をし、目的達成のための方法、実験処置、飼育管理を含めた取扱いの妥当性などについて必要かつ十分な検討を行った。また、国立感染症研究所内に設置されている動物実験委員会でプロトコルの承認を受けている。

C. 研究結果

個々のマーカー遺伝子の発現解析を行ったところ、多くの遺伝子で毒性参照品の濃度依存的な発現上昇を認めた。しかし、その変動率はラットと比較すると非常に緩やかなものであった(図 6)。一方、いずれの検体でも全く発現が変動しない遺伝子(Csf1)や、毒性参照品での濃度依存性が認められない遺伝子(lfi47, Tap2, Cxcl9, Cxcl11, Zbp1)があった。高濃度 HA 原液接種群(3 倍濃度)では、一部の検体接種群において、有意な発現量の増加を認めるマーカー遺伝子があった(Mx2, Psme1, lrf7, Cxcl9, Cxcl11)。

次に、全マーカー遺伝子の発現パターンの類似性から、クラスター解析を行った。その結果、ラットの場合と同様に 3 個のクラスターに分類することができた。1 個目のクラスターは毒性参照品(1U/mL、0.25U/mL)接種群、2 個目のクラスターは毒性参照品(0.5U/mL、0.12U/mL)と HA 原液(3 倍濃度の一部)接種群、3 個目のクラスターは HA 原液(3 倍濃度の一部、1 倍濃度)と生理食塩水接種群であった(図 7)。毒性参照品の 0.5U/mL と 0.25U/mL 接種群は分類されるべきクラスターが逆転し、ラットのデータと相違が見られた。

D. 考察

マウスにおけるマーカー遺伝子の発現変動は、ラットの場合と同様の傾向を示し、マウスとラットで共通のマーカー遺伝子が活用できる可能性が示唆された。ただし、

マウスにおけるマーカー遺伝子の発現変動は個体差があり、データのばらつきが比較的大きかった。また、毒性参照品を用いた解析において、マーカー遺伝子の発現変動はラットほど鋭敏ではなく、濃度依存的な変動が認められない遺伝子も散見された(図 6 : lfi47, Tap2, Csf1, Cxcl9, Cxcl11, Zbp1 等)。図 7 のクラスター解析で毒性参照品の 0.5U/mL と 0.25U/mL の分類クラスターが逆転したのは、これら濃度依存的な発現変動を認めないマーカー遺伝子の存在に起因するものと考えられた。したがって、データの信頼性、安定性、試験感度の観点からは、マウスよりラットの方が適していると考えられた。

本研究においてはラットでの解析に倣い、ワクチン接種後 24 時間目の肺における遺伝子発現解析を行った。一方、従来法であるマウス白血球数減少試験ではワクチン接種後 12-18 時間目の末梢白血球数、マウス体重減少試験ではワクチン接種後 24 時間目の体重を測定することを考えると、より早い時間での採材が必要である可能性もある。また、マウス系統、週齢等を検討することでマウスでも感度向上が図れる可能性があり、今後の検討課題である。

E. 結論

我々が構築している遺伝子発現解析による新規安全性試験法で、試験動物の変更が可能か検討を行った。ラットとマウスで共通のマーカー遺伝子が活用できる可能性が示唆されたが、データの安定性

や試験感度の観点から、マウスよりもラットのほうが試験動物として適していると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

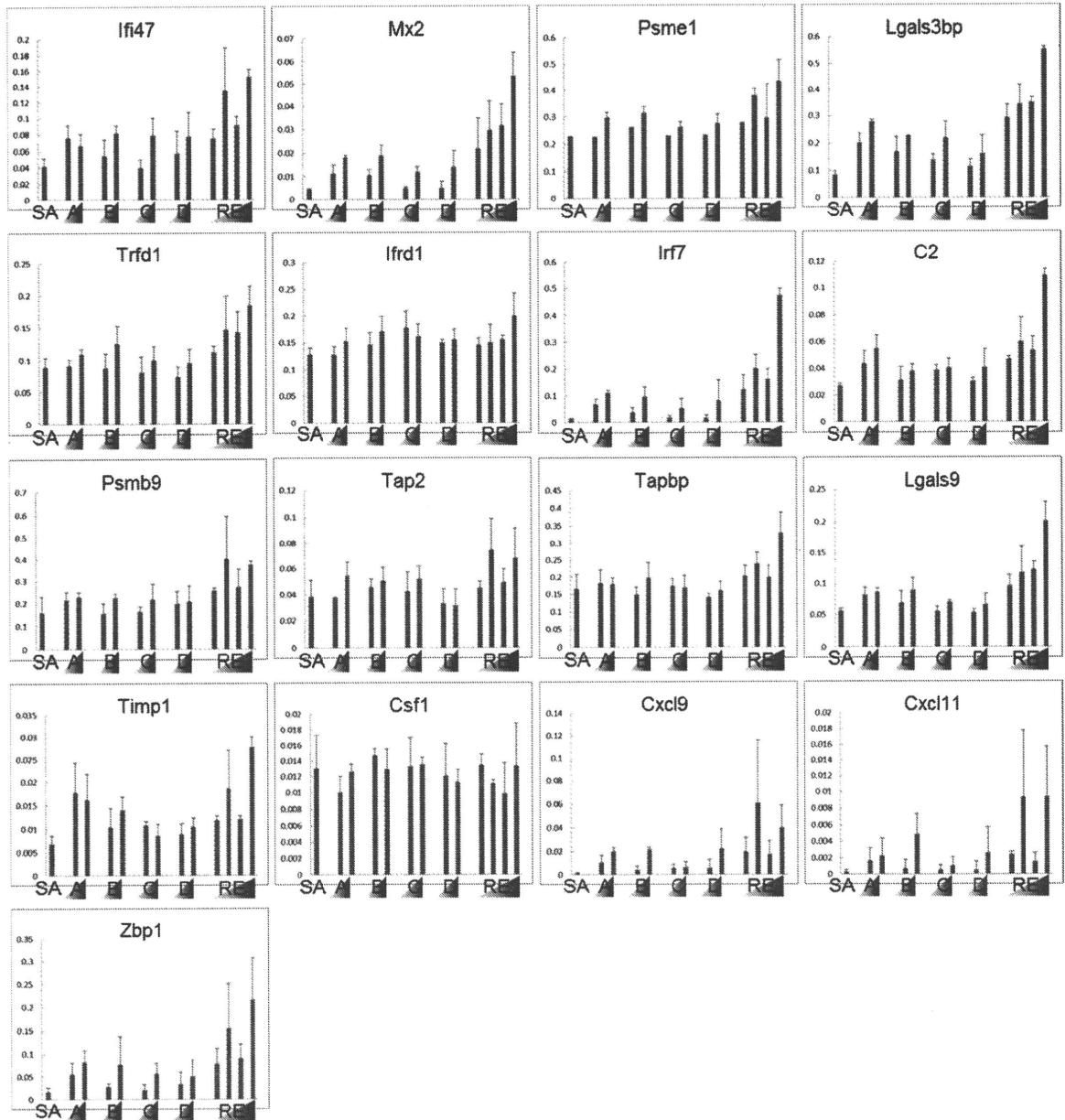


図 6. 毒性参照品、および高濃度 HA 原液接種に伴う
マーカー遺伝子の発現変動

毒性参照品、および高濃度 HA 原液を段階希釈し、これらを接種したマウス肺におけるマーカー遺伝子の発現量を測定した。各遺伝子の発現量(縦軸)は、 β -actin に対する相対定量で示した。

SA; 生理食塩水接種群、A~D;高濃度 HA 原液接種群(4 ロット分)。各群 左から最終小分け製品の 1 倍濃度、3 倍濃度の検体を接種、RE; マウス白血球数減少試験用毒性参照品接種群。左から 0.12U/mL、0.25U/mL、0.5U/mL、1U/mL の検体を接種。

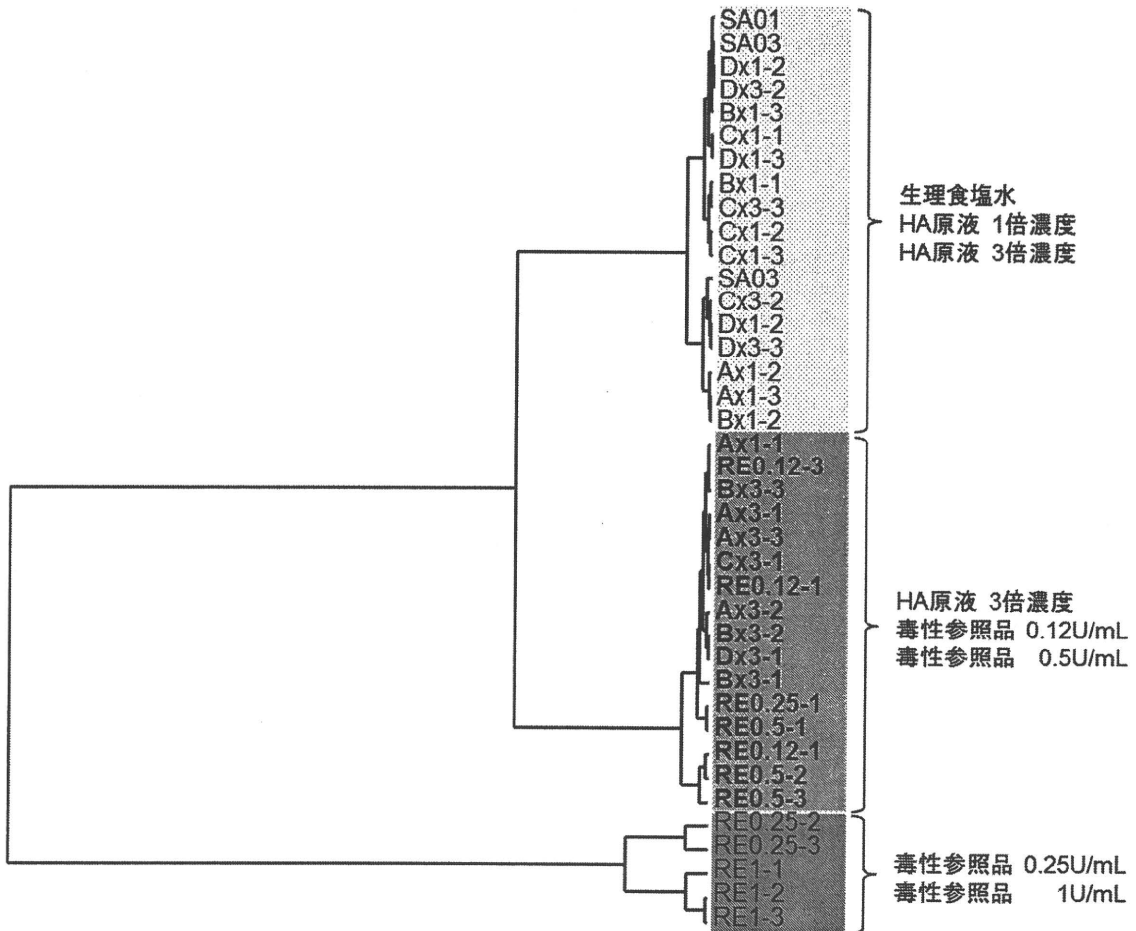


図 7. マーカー遺伝子の発現パターンを基にしたクラスター解析
 QGP 法から得られた相対発現量を基に、各サンプルにおける 17 のマーカー遺伝子の発現パターンの類似性からクラスター解析を行った。

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

インフルエンザワクチンのマウス白血球数減少試験の再評価に関する研究

分担研究者 持田恵子 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

研究要旨

インフルエンザ HA ワクチンのマウス白血球数減少試験 (LP 試験) の精度向上を目的に、小分け製品に代わりワクチン高濃度原液での試験管理について検討を行った。感染研および 4 製造所において HA ワクチン高濃度原液 (600 µg/mL) について LP 試験の再現性と施設間差の比較を行った結果、感染研と製造所の両施設で LP 活性が検出されたものは 36 検体中 12 検体 (33.3%) であったが、いずれも現行の小分け製品に適用される 0.2 U/mL の基準値を下回った。一方、両施設で検出限界以下を示したものは 9 検体 (25%) であった。このことから、インフルエンザ HA ワクチンには有意な LP 活性は含まれないものと結論づけられ、LP 試験は現行の小分け製品に代わり高濃度ワクチン原液で品質管理することが妥当であると考察された。

研究協力者

福田 靖 (国立感染症研究所
・細菌第二部)

大塚菜緒 (同上)

久保田真由美 (同上)

鯉坂裕美 (同上)

蒲地一成 (同上)

甲斐 光 (デンカ生研株式会社)

山口 保 (同上)

浦山重信 (北里研究所)

藤田順二 (阪大微生物病研究会)

尾堂浩一 (化学及血清療法研究所)

徳永英治 (同上)

A. 研究目的

インフルエンザワクチンの安全性を確認するための試験として実施されているマウス白血球数減少試験 (以下 LP

試験と略す) については、これまでも測定精度および再現性に問題のあることが指摘されてきた。そこで、平成 21 年度の当該研究事業では、試験精度の

向上を目的に試験動物のマウス系統やマウス週齢について検討を加え、さらに HA ワクチン高濃度原液での試験管理の可能性についても検討を加えた。その結果、LP 試験はタンパク濃度の低い小分け製品に代わり高濃度ワクチン原液を用いて品質管理することが有用であると判断された。

本年度は高濃度原液を用いた試験管理の有用性を検証するため、感染研とワクチン製造所とが共同してその再現性と施設間差について検討を行った。国内 4 製造所において、同一検体の測定を 3 回繰り返し、同一施設内での再現性評価も同時に実施した。また、動物愛護の観点から使用動物数を減らした試験管理についても考察を加えた。

B. 研究方法

(1) 検体および参照品

標準品としてインフルエンザ全粒子ワクチンを凍結乾燥したマウス白血球数減少試験用毒性参照品 (L-4) を用いた。検体として 4 製造所から供与された 3 種類のウイルス株 (A/California/7/2009、A/Victoria/210/2009、B/Brisbane/60/2008) 由来ワクチン高濃度原液の各 3 ロットを用いた。検体の表記は表 2 に示すように、製造所名 (A~D) と 1 から 9 までの通し番号で示した。最終タンパク濃度を生理食塩水で 600 µg/mL に調製し、600 µg/mL に満たない検体は希釈せずに用いた。

(2) マウス白血球数減少 (LP) 試験

毒性参照品は生理食塩水により 2 倍間隔で 5 段階に希釈した。毒性参照品および濃度を調製した検体 (0.5 mL) を、1 群 10 匹の ddY マウス (4 週齢、♀) の腹腔内に投与した。投与 12~18 時間後にマウスの尾静脈より採血し、コールターカウンターで白血球数を測定した。感染研は 4 製造所からの計 36 検体を 2 回の試験に分け各検体につき 1 回試験し、製造所は自社の 9 検体を 3 回繰り返し試験した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て実施した。なお、ヒト材料を研究対象としないため、倫理上の問題は発生しない。

C. 結果

1. 感染研と製造所における試験成績の比較

図 8 に感染研と製造所における LP 試験成績の相関を示した。感染研は 1 回の試験成績、製造所は 3 試験の平均値を示し、本試験の検出限界は両施設ともに 0.0625 U/mL であった。感染研と製造所の両施設で LP 活性が検出されたものは 36 検体中 12 検体 (33.3%) であったが、いずれも現行の小分け製品に適用される 0.2 U/mL の基準値を下回った。一方、両施設で検出限界以下を示したものは 9 検体 (25%) であっ

た。

2. 高濃度原液を用いた LP 試験の再現性

4 製造所 (A~D) における 3 回の繰り返し試験成績を図 9~図 12 に示した。3 製造所 (A, B, C) の高濃度原液 27 検体は繰り返し試験においてすべて小分け製品に適用される基準値 (0.2 U/mL 以下) を下回った。一方、D 製造所の 2 回目の試験において検体 D5 が 0.2 U/mL を超えたが、その他はすべて 0.2 U/mL 未満であった。0.2 U/mL を試験再現性の指標とした場合、繰り返し試験には高い再現性が認められた。

3. 毒性参照品と白血球減少率の相関

図 13 に毒性参照品と白血球減少率との関係を示した。毒性参照品の LP 活性 (対数値) と白血球減少率の間には相関が認められ、白血球数の減少率 40 から 80% までの間には良好な直線性を認めた。高濃度原液の LP 活性が製品のタンパク濃度に依存すると仮定した場合、高濃度原液 (600 µg/mL) の基準値は 0.6 U/mL と設定され、0.6 U/mL に相当する生理食塩水に対する白血球数減少率は 45% と算出された。

D. 考察

平成 21 年度の当該研究事業において、現行の 0.2 U/mL を基準値とする LP 試験には再現性の問題点があることから、高濃度原液を用いた品質管理の必要性が指摘された。また、先の研究ではイ

ンフルエンザ HA ワクチンの高濃度原液には有意な LP 活性が検出されず、HA ワクチンには白血球数減少を引き起こす生理活性物質はほとんど含まれていない可能性が指摘されている。そこで、当該年度はワクチン製造所とともに高濃度原液の評価を進め、試験成績の比較ならびに再現性について検討を加えた。その結果、ワクチン高濃度原液には有意な LP 活性は検出されず、4 製造所における 3 回の繰り返し試験においても、ほぼすべての検体が現行の小分け製品に適用される 0.2 U/mL を下回ることが判明した。このことから、インフルエンザ HA ワクチンには有意な LP 活性が含まないものと結論づけられた。

今回の研究において、ワクチン高濃度原液に LP 活性がほとんど検出されなかったことから、現行の小分け製品を対象とする LP 試験によりわずかに混入する LP 活性を正しく評価することは困難である。そのため、現行の小分け製品に対する試験管理に代え、高濃度原液を用いた LP 試験の実施が必要である。LP 活性が製剤のタンパク濃度に依存すると仮定した場合は、600 µg/mL の高濃度原液に対し 0.6 U/mL の基準値が適用可能と考えられる。しかし、今回得られた成績だけでは、濃度依存性があるかは不明である。今後、規格値設定については十分な検討が必要である。

近年、動物愛護の観点から実験に供

試する動物数の削減が求められるとともに、*in vitro* 試験法への代替が推奨されている。当該試験は LP 活性を引き起こす物質がまだ同定されていないため *in vitro* 試験法への移行は難しい状況にあるが、マウス数の削減は参照品を除くことにより実施の可能性が残されている。すなわち、毒性参照品に代わり生理食塩水を用いて白血球数減少率を規格値とすることにより、動物数の削減が可能となる。今後、規格値と同様に検討が必要である。

E. 結論

インフルエンザ HA ワクチンのマウス白血球数減少試験は、現行の小分け製品に代わり高濃度ワクチン原液で品

質管理する妥当性についての更なる検討が必要であると考察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 2 使用したワクチン株の表記法

ワクチン株の表記

表記	製造所	ウイルス株	ロット
A1	A社	A/California/7/2009	1
A2	同上	同上	2
A3	同上	同上	3
A4	同上	A/Victoria/210/2009	1
A5	同上	同上	2
A6	同上	同上	3
A7	同上	B/Brisbane/60/2008	1
A8	同上	同上	2
A9	同上	同上	3

B、C、D社においても同様に1から9までの通し番号で表記した。

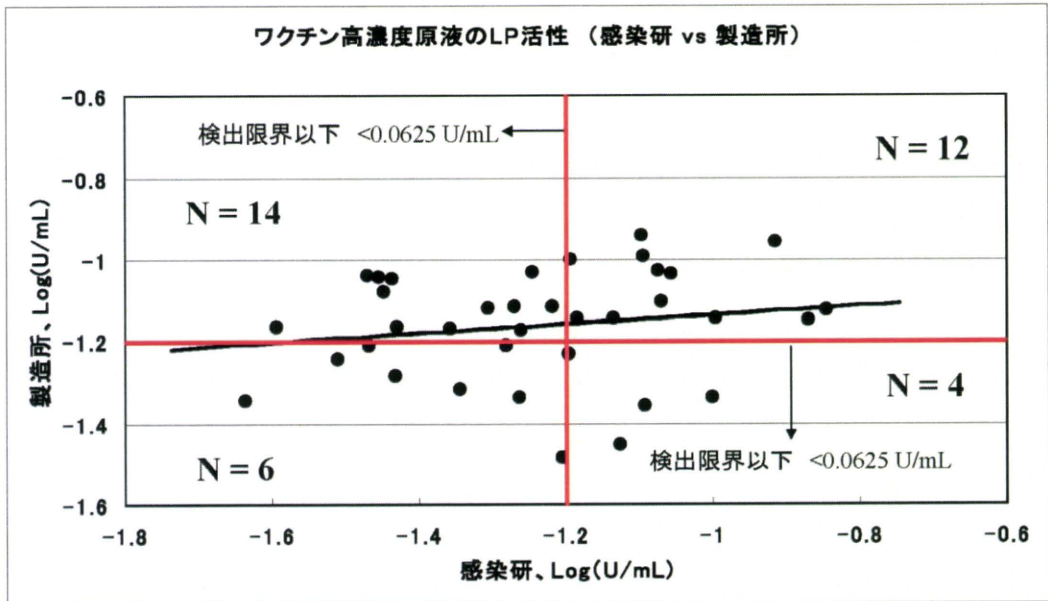


図8 ワクチン高濃度原液のLP活性の感染研と製造所との比較
 本試験の検出限界 (0.0625 U/mL) を図中に示した。

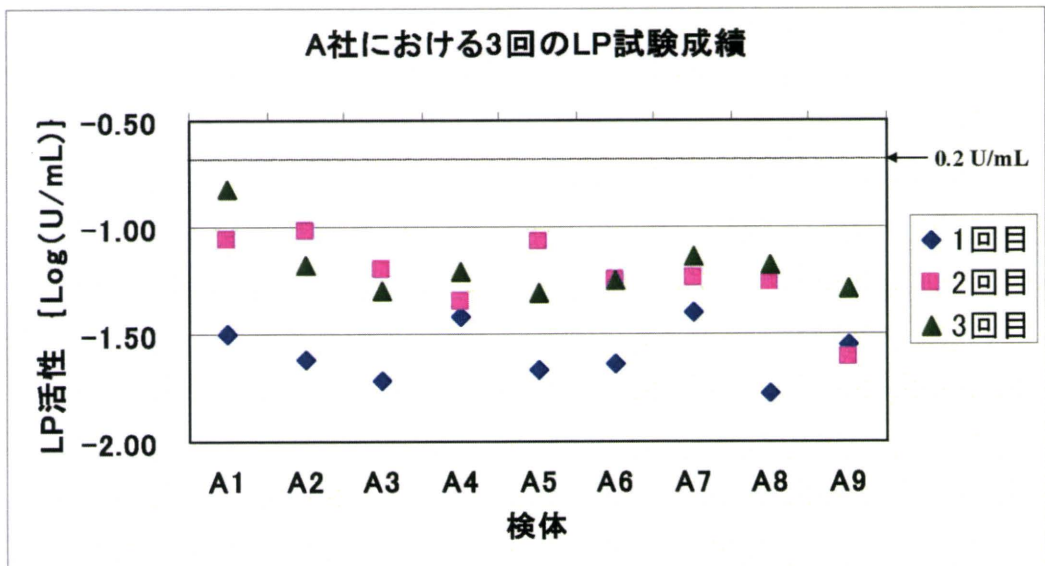


図9 A社における3回の繰り返し試験成績

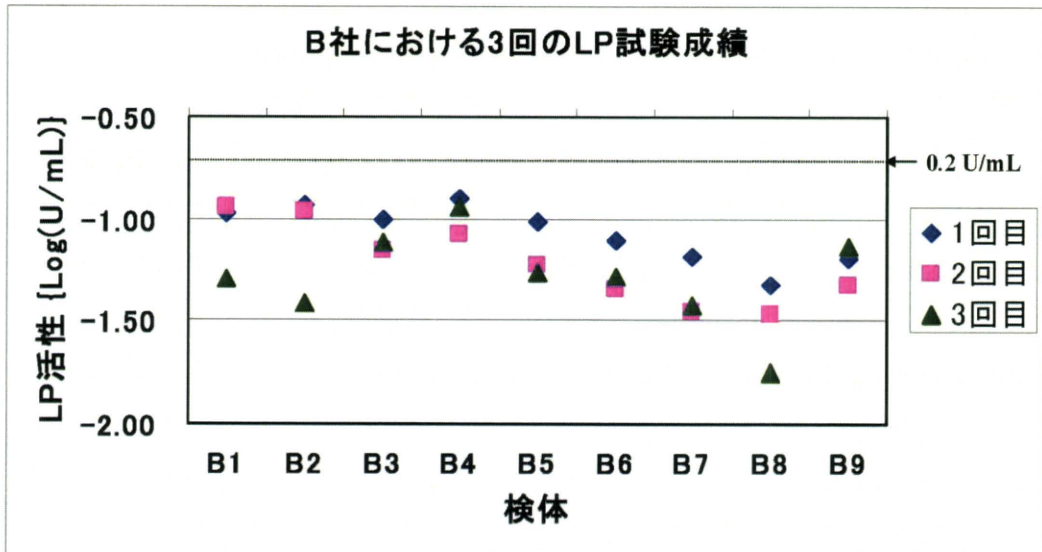


図 10 B社における3回の繰り返し試験成績

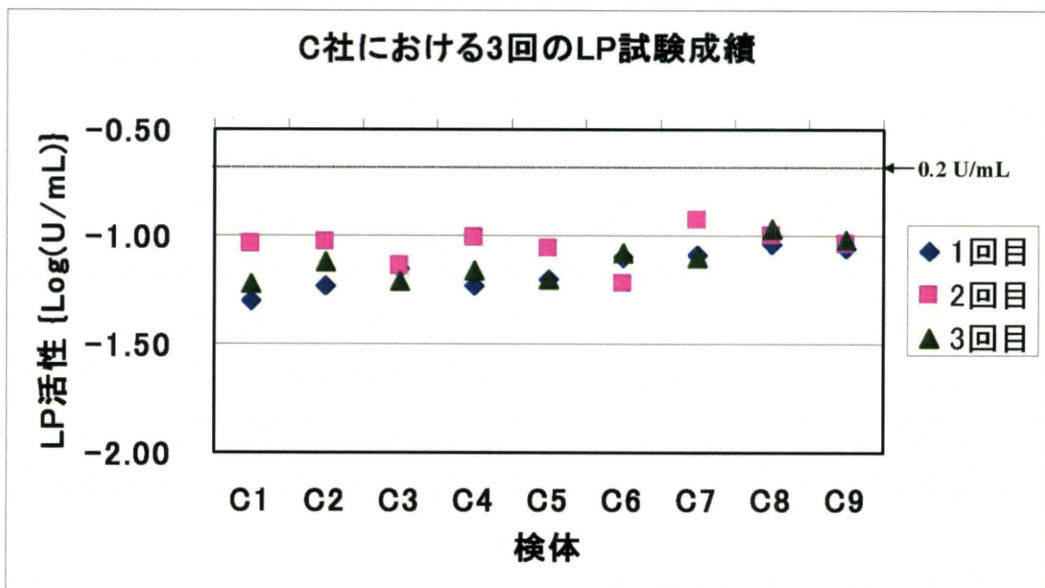


図 11 C社における3回の繰り返し試験成績

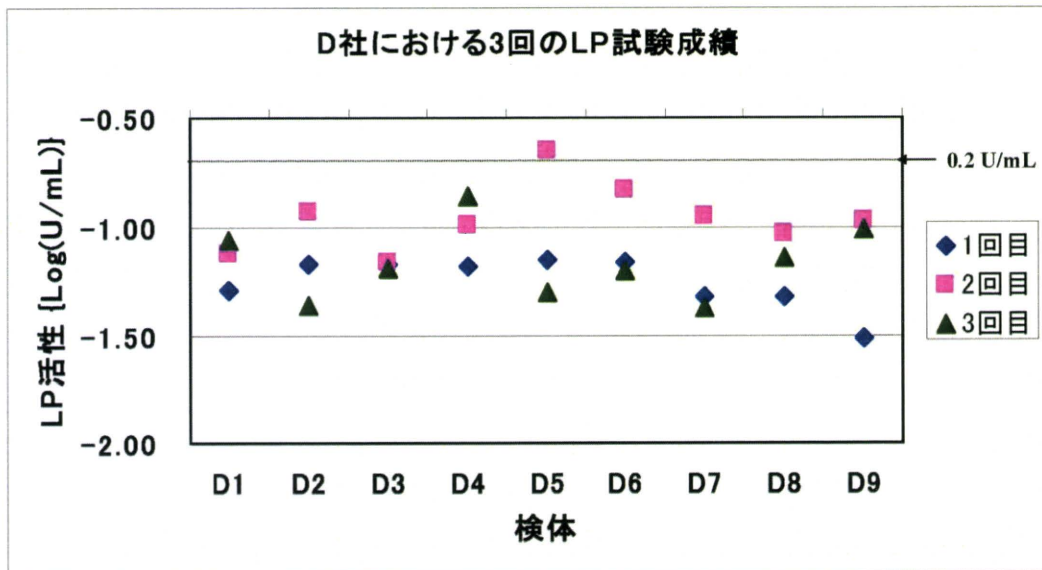
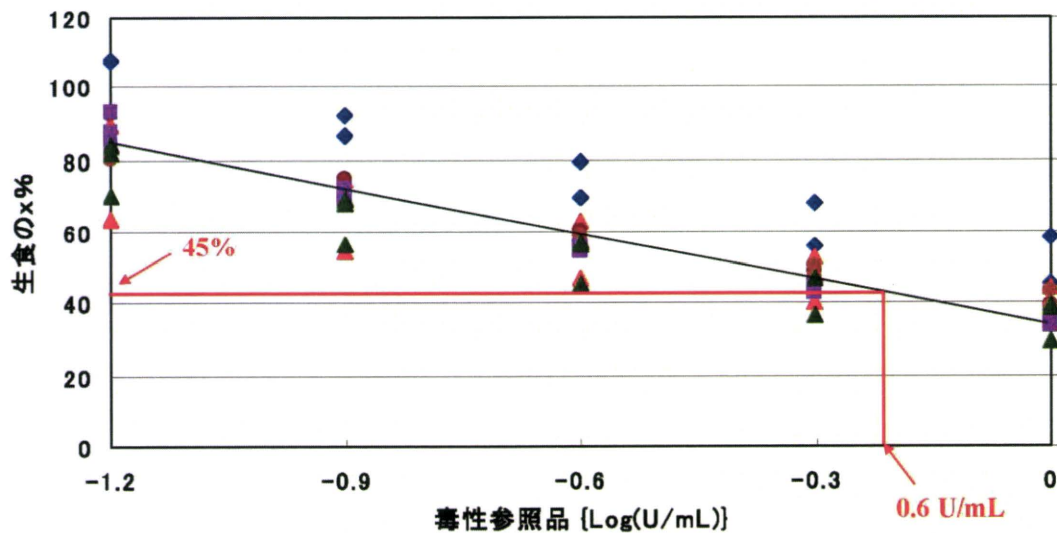


図 12 D社における3回の繰り返し試験成績



毒性参照品の0.6 U/mLに相当する白血球数は生食投与群の45%だった。

図 13 毒性参照品の力価と生理食塩水投与マウスの白血球数の割合 (%) との関係

14回の試験において、毒性参照品の各希釈段階液を投与したマウスの白血球数が生理食塩水投与マウスの白血球数の何パーセントに相当するかを計算し、プロットした。毒性参照品の0.6 U/mLに相当する値として「生理食塩水投与マウスの白血球数の45%」を求めた。

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

インフルエンザワクチンによる白血球減少のメカニズムに関する研究

研究分担者 阿戸 学 国立感染症研究所・免疫部・第二室長

研究協力者 高橋宜聖 国立感染症研究所・免疫部・第四室長

研究協力者 小林和夫 国立感染症研究所・免疫部・部長

研究要旨

インフルエンザワクチンの安全性試験としてのマウス白血球減少試験における白血球減少が、走化活性因子の影響による末梢血から臓器への移動によるか否かについて解析を行った。白血球減少試験と同様に、白血球減少を引き起こすインフルエンザ全粒子ワクチンとともに、ケモカインレセプターからの細胞内シグナルを阻害する百日咳毒素(PTX)を C57BL/6 マウスに投与したところ、PTX 投与群は、末梢白血球の減少に変化を示さないことから、インフルエンザワクチン投与後の白血球減少は、走化因子非依存性の機序によって起こることが示唆された。

A. 研究目的

インフルエンザワクチンは近年接種者の増加と、接種対象者が学童から高齢者を中心としたハイリスク者に変化したことから、ワクチンの安全性の確保と安定供給が、国民の健康を守るため、厚生労働政策上重要な課題となってきた。我が国でのワクチン安全性試験の一つとして、マウスに HA ワクチン接種後 16 時間で対照群の 80%を下回る白血球減少を起こしてはならないとする、マウス白血球減少試験が行なわれているが、海外ではこの試験は行われておらず、その意義

に関しては議論がある。一方、アメリカでは我が国ではみられないワクチン接種後の副反応によるとも考えうる死亡例が報告され、我が国ではマウス白血球減少活性を管理して現在まで副反応の低いワクチン供給を続けて来た現状を考え、この試験の有用性を慎重に検討する必要がある。しかし、この白血球減少活性の実体についてはほとんど明らかにされていない。このため我々は、ワクチンの安全性に関係すると考えられているマウス白血球減少試験について免疫学的に検証し、より精度の高いマウス白血球減少試験の

方法を確立するとともに、白血球減少活性を誘導する要因について明らかにする目的で解析を行なった。本研究の遂行は、本活性とワクチン本体との関係を明らかにし、ワクチンの安全性向上のための品質管理の技術を向上させる。

B. 研究方法

1) インフルエンザワクチンの調整

白血球減少試験参照品不活化全粒子ワクチン A1/PR8 (H1N1)は、現行ワクチンと同様に HA 濃度が 90 μ g/ml となるよう生理食塩水で希釈し、接種した。

2) マウス白血球減少

国家検定に準じて、C57BL/6 マウス(メス、4 週齢)の腹腔内に、500 μ l のワクチン溶液または生理食塩水を投与し、同時に尾静脈より百日咳毒素(pertussis toxin: PTX)500 μ g または、コントロールとして百日咳毒素 B-オリゴマー500 μ g を静脈投与した。16 時間後に尾静脈より 10 μ l 採血して末梢血細胞を蛍光標識された抗 B220, 抗 CD3, 抗 Gr-1 のそれぞれの抗体を用いて染色し、フローサイトメトリー (FACS Calibur、ベクトンディッキンソン社)を用いて死細胞を除いた総細胞数および各細胞分画の実数を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立感染症研究所が定めた動物実験指針を遵守し、実験動物の愛護に十分考慮して苦痛を与えな

いように配慮しながら行なわれた。

C. 研究結果

マウスに白血球減少を引き起こすことがわかっているインフルエンザ全粒子ワクチン、もしくは生理食塩水を接種し、接種後に末梢血の各細胞分画の実数を測定した。その結果、核数の計測による現行検定と同様に、HA ワクチン全粒子ワクチン投与群で 16 時間後に末梢血細胞の有意な減少を認めた。また、FACS による解析から、減少する細胞の分画は、主として T 細胞と B 細胞であることが示唆された。末梢血白血球の減少が多臓器への移動によるかどうかを検索する目的で、白血球の生体内移動に必要なケモカイン受容体等の細胞内シグナル伝達を阻害することが知られている百日咳毒素 (pertussis toxin: PTX)を全粒子ワクチン、または生理食塩水と同時にマウスに投与した。また、PTX のコントロールとして、ケモカイン受容体シグナルの阻害作用のない百日咳毒素 B-オリゴマーを投与した。ワクチン接種末梢血より細胞を調整し、FACS を用いた蛍光染色により T リンパ球、B リンパ球および顆粒球の細胞数を計測した。その結果、生理食塩水と PTX を投与した群では、ケモカインの作用でリンパ組織に遊走していたリンパ球が末梢血中に流入することにより、末梢血数の上昇が認められた。これにより、PTX の作用が、解析時において持続していることが確認された。一方、全粒子ワクチ

ンの投与後の末梢血白血球数減少は、PTX 投与群と B オリゴマー投与群で有意差を認めなかった(図 14)。

以上のことから、ワクチン接種後の末梢血減少機序は遊走因子による生体内移動に依存しない可能性が判明した。

D. 考察

インフルエンザワクチン投与後の白血球減少の機序を明らかにすることは、白血球減少試験の改善もしくはこの試験に代替可能な新規安全性試験の開発に重要である。白血球減少の機序として、1)インフルエンザワクチンの成分によって誘導される白血球走化因子の濃度勾配に従い、臓器内に移動する。2)インフルエンザワクチンによって誘導されるサイトカインなどが、末梢血白血球に作用して、細胞死を誘導する。という 2 つの可能性が考えられる。今回、我々は、走化因子の受容体細胞内シグナル伝達に共通に使用する低分子 GTP 蛋白のリン酸化を阻害する百日咳毒素をマウスに投与することによって、1)の可能性について検証した。末梢血白血球の走化因子受容体シグナルの阻害によっても、白血球減少が認められることから、白血球減少試験で認められる末梢白血球の減少は、走化因子による白血球の移動によるものではなく、末梢白血球自体に生じる変化によって起こることが示唆された。今後、末梢白血球の内皮細胞への接着能の変化や、細胞死が誘導されるか否かを詳細に解析して、

インフルエンザワクチンによる白血球減少機序を明らかにし、白血球減少試験に変わるより精度の高い分子マーカーを同定し、新規迅速安全評価法の開発に貢献することを今後の研究で目指す。

E. 結論

インフルエンザワクチンの安全性試験としてのマウス白血球減少試験における、接種後の白血球減少活性の実体について解析した。その結果、白血球減少を引き起こすインフルエンザ全粒子ワクチンとともに、ケモカインシグナルを阻害する百日咳毒素(PTX)をマウスに投与したところ、PTX 投与群は、末梢白血球の減少に変化を示さないことから、白血球減少は走化因子非依存性の機序によって起こることが考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kurosaki T, Aiba Y, Kometani K, Moriyama S, Takahashi Y. 2010. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunol. Rev.*, 237, 104-116

2) Yuki N, Takahashi Y, Ihara T, Ito S, Nakajima T, Funakoshi K, Furukawa K, Kobayashi K, Odaka, M. Lack of antibody response to Guillain-Barre

syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination. **J. Neurol, Neurosurg. & Psychiatry** *in press*

3) Ozeki Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2010. Transient role of CD4+CD25+ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. **Int. Immunol.** 22: 179-189.

2. 学会発表

1) Onodera, T., R. Aizawa, A. Koyabashi, M. Ato, A. Hosono, S. Kaminiogawa, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2010. T-cell independent activation of virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling. 4th International conference on "B cells and autoimmunity"(奈良、8月)

2) Onodera, T., R. Aizawa, A. Hosono, S. Kaminiogawa, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2010. T-cell independent activation of virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling. 14th International Congress of Immunology (神戸、8月)

3) 高橋宜聖 千葉大 G-COE シンポジウム Protective memory B cells against influenza virus infection in the lungs (東京、12月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

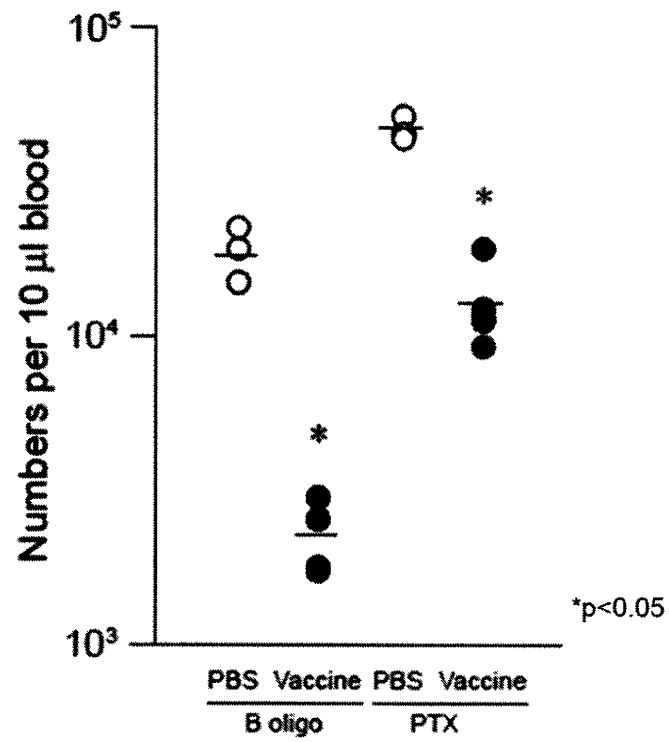


図 14. 全粒子ワクチンおよび百日咳毒素接種後の C57BL/6 マウス末梢血 10 μ l 中の総白血球数

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Momose H, Mizukami T, Ochiai M, Hamaguchi I, Yamaguchi K	A new method for evaluation of vaccine safety based on comprehensive gene expression analysis.	Journal of Biomedicine and Biotechnology	2010	ID: 3618 41 (7p)	2010
Kurosaki T, Aiba Y, Kometani K, Moriyama S, Takahashi Y	Unique properties of memory B cells of different isotypes.	Immunological Reviews	237	104- 116	2010
Ozeki Y, Sugawara I, Udagawa T, Aoki T, Osada-Oka M, Tateishi Y, Hisaeda H, Nishiuchi Y, Harada N, Kobayashi K, Matsumoto S	Transient role of CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice.	International Immunology	22	179- 189	2010

Review Article

A New Method for the Evaluation of Vaccine Safety Based on Comprehensive Gene Expression Analysis

Haruka Momose,¹ Takuo Mizukami,¹ Masaki Ochiai,²
Isao Hamaguchi,¹ and Kazunari Yamaguchi¹

¹Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

²Division of Quality Assurance, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

Correspondence should be addressed to Kazunari Yamaguchi, kyama@nih.go.jp

Received 30 September 2009; Accepted 2 April 2010

Academic Editor: Yongqun Oliver He

Copyright © 2010 Haruka Momose et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

For the past 50 years, quality control and safety tests have been used to evaluate vaccine safety. However, conventional animal safety tests need to be improved in several aspects. For example, the number of test animals used needs to be reduced and the test period shortened. It is, therefore, necessary to develop a new vaccine evaluation system. In this review, we show that gene expression patterns are well correlated to biological responses in vaccinated rats. Our findings and methods using experimental biology and genome science provide an important means of assessment for vaccine toxicity.

1. Introduction

Vaccination effectively enables the control of many infectious diseases. However, we cannot always avoid the problem of adverse reactions accompanied by vaccination. While most adverse reactions are mild and local, some vaccines have been associated with very rare but severe systemic reactions. Therefore, all vaccines for public use are made in compliance with Good Manufacturing Practices (GMP) to prevent safety problems. Furthermore, manufacturers must submit samples and results of their in-house tests for each vaccine batch to the national control authorities before vaccines are released into the market. Among many quality control tests, conventional animal safety tests are performed to detect vaccine toxicity because residual vaccine toxicity has the potential to cause adverse reactions. For example, the animal body weight change test is the most commonly used test to evaluate the toxicity of vaccines [1]. Although a good correlation of the body weight loss with a vaccine's toxicity has been shown [2, 3], a greater understanding of the molecular mechanisms involved in the reaction to a vaccine's toxicity is needed. We, therefore, attempted to measure

animals' responses to vaccines by determining changes in gene expression profiles.

Gene expression profiling is a unique way to characterize how cells or tissues are affected by abnormal conditions. The measurement of gene expression levels upon exposure to toxicants can be used to identify toxic products, and to provide information about the mechanism of toxicity [4]. DNA microarray technology has opened the way for the parallel detection and analysis of expression patterns of thousands of genes in a single experiment. Furthermore, the development of high-quality gene arrays has allowed DNA microarray technology to become a standard tool in molecular toxicology. Recently, the field of toxicogenomics has validated the concept of gene expression profiles as "signatures" of toxicant classes [5–7]. These signatures have effectively directed the analytical search for predictive toxicant biomarkers and they have contributed to the understanding of the dynamic responses of molecular mechanisms associated with toxic responses. In fact, many studies of gene-expression profiles have now been reported in the toxicology field. For example, Hamadeh et al. reported patterns of gene expression in liver tissue taken from rats exposed to different